

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-318450

(43) 公開日 平成11年(1999)11月24日

(51) Int.Cl. <sup>8</sup>	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A
	5/10	C 1 2 Q 1/66	
C 1 2 Q 1/66			1/68 A
	1/68	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15			33/53 Y
審査請求 未請求 請求項の数14 F D (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-142346

(22) 出願日 平成10年(1998)5月8日

(71) 出願人 592246875

株式会社ベッセルリサーチ・ラボラトリー  
東京都町田市旭町3丁目6番6号

(72) 発明者 永井 良三

群馬県前橋市国領町2-22-B-104

(72) 発明者 倉林 正彦

群馬県前橋市南町2-15-9

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54) 【発明の名称】 平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法

(57) 【要約】

【課題】 B T E B 2タンパクが動脈硬化を悪化させるタンパクのプロモーターに結合して高い発現活性が誘導されるという特性を利用した平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法、およびこのような評価方法に用いる宿主細胞を提供することを目的とする。

【解決手段】 B T E B 2と結合するDNA部位を有するプロモータと、その下流に作動可能に連結されたレポータ生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有する宿主細胞を用い、B T E B 2と被評価物質との存在下、宿主細胞内で前記レポータ生成物を発現させた後、このレポータ生成物を検出することを特徴とする平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有する宿主細胞を用い、BTEB2と被評価物質との存在下、宿主細胞内で前記レポーター生成物を発現させた後、このレポーター生成物を検出することを特徴とする平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法。

【請求項2】 前記BTEB2が、前記宿主細胞内に導入されたベクターであって、BTEB2タンパクを発現するBTEB2遺伝子を少なくとも有する第2のベクターにより産生されたものであることを特徴とする請求項1記載の評価方法。

【請求項3】 前記宿主細胞が、培養動物細胞であることを特徴とする請求項1または2に記載の評価方法。

【請求項4】 前記宿主細胞が、ヒト腎臓由来の細胞株293細胞であることを特徴とする請求項3に記載の評価方法。

【請求項5】 前記宿主細胞が、ウシ肺動脈内皮細胞株cPAE細胞であることを特徴とする請求項3に記載の評価方法。

【請求項6】 前記レポーター生成物がルシフェラーゼであることを特徴とする請求項1から請求項5までのいずれか一項に記載の評価方法。

【請求項7】 BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターが、動脈硬化を悪化させるタンパクをコードする遺伝子のプロモーターであることを特徴とする請求項1から請求項6までのいずれか一項に記載の評価方法。

【請求項8】 前記動脈硬化を悪化させるタンパクが、組織因子であることを特徴とする請求項7に記載の評価方法。

【請求項9】 前記動脈硬化を悪化させるタンパクが、Egr-1であることを特徴とする請求項7に記載の評価方法。

【請求項10】 前記動脈硬化を悪化させるタンパクが、iNOSであることを特徴とする請求項7に記載の評価方法。

【請求項11】 前記動脈硬化を悪化させるタンパクが、SMemであることを特徴とする請求項7に記載の評価方法。

【請求項12】 BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有することを特徴とする宿主細胞。

【請求項13】 BTEB2タンパクを発現するBTEB2遺伝子を少なくとも含む第2のベクターを有することを特徴とする請求項12記載の宿主細胞。

【請求項14】 請求項1記載の評価方法により得られ

た平滑筋細胞形質変換制御剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、動脈硬化巣における平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法に関するもので、特に、BTEB2タンパクが特異的に結合するDNA配列に結合して起きる転写活性を制御する物質を評価して、スクリーニングする方法に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】動脈硬化巣の血管内膜肥厚部には多数の平滑筋細胞が存在する。さらに内膜肥厚部に存在する平滑筋細胞は中膜に存在する収縮型の形質を失い、合成型の形質に変換している(Aikawa M. et al., Circulation Research, 73:1000 (1993))。この平滑筋細胞の形質の変換は、電子顕微鏡観察による細胞形態の変化として捉えることができる(Wanibuchi H. et al., Cardiovascular Pathology, 1:295(1992))が、平滑筋細胞における、特定のタンパクの発現変化によっても捉えることができる。

【0003】このような特定のタンパク、すなわち平滑筋細胞の形質が収縮型から合成型に変換する際に発現が変化するタンパクとしては、例えば、SMemb、SM2、組織因子、Egr-1、iNOS等を挙げることができる。なお、以下これらのタンパクを動脈硬化を悪化させるタンパクとする。SMembは、肥厚した内膜の平滑筋だけに特異的に発現している(Ueda M. et al., Coronary Artery Disease, 6:71 (1995))。また、SM2は中膜の平滑筋だけに特異的に発現している(Aikawa M. et al., Circulation, 96:82(1997))。組織因子は、血栓形成に関与することが知られるが、内膜肥厚部の平滑筋細胞で発現が増加するものでもある(Taubman MB, American Journal of Cardiology, 72:55C (1993))。また、Egr-1は転写調節因子の一つで血管障害時に発現が増大する(Khachigan LM et al., Science 271:1427 (1996))。iNOSは細胞障害に関与することが知られるが、内膜肥厚部の平滑筋細胞で発現が増加する(Yan ZQ et al., Circulation Research, 79:38 (1996))。

【0004】これら特定のタンパク、すなわち動脈硬化を悪化させるタンパクの発現は、遺伝子発現転写調節領域と呼ばれる遺伝子配列で制御される。このような遺伝子発現転写調節領域に、転写因子であるDNA配列結合タンパクが結合することにより上記タンパクの発現が制御されるのである。この遺伝子発現転写調節領域の配列については、SMemb(真鍋一郎ら、最新医学, 50:68 (1995))、組織因子(Mackman N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2254 (1990))、Egr-1(Sakamoto KM et al., Oncogene, 6:867 (1991))、およびiNOS(Chartrain NA et al., Journal of Biological

lChemistry, 269:6765 (1994)) について、それぞれ明らかにされている。

【0005】また、上記DNA配列結合タンパクとしては、BTEB2を挙げることができる。このBTEB2は、SMemb遺伝子発現調節DNA配列結合タンパクとして同定されており（渡辺他、Japanese Circulation Journal, 60:suppl. 1:64(1996)）、ラットやウサギにおける血管バールン障害モデルにおいて、新生内膜の平滑筋細胞で高発現するものである。さらに、このBTEB2は、SMembのみならず、組織因子、Egr-1、iNOS等の他の動脈硬化を悪化させるタンパクの遺伝子発現転写調節領域に対しても転写因子として働き、各タンパクの発現を制御するものである。

【0006】上記動脈硬化を悪化させるタンパク、すなわち平滑筋細胞の形質が収縮型から合成型に変換する際に発現が変化するタンパクは、平滑筋細胞の形質の変換に何らかの形で影響を与えるタンパクであるといえる。したがって、この動脈硬化を悪化させるタンパクの発現を制御することにより、平滑筋細胞の形質の収縮型から合成型への変換を制御することが可能となる。よって、このようなタンパクの発現を制御する制御剤を同定し、投与することにより、動脈硬化巣の平滑筋細胞形質変換を制御することができ、治療的利益を得ることができる。

#### 【0007】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、これまでのところ上述の作用機構に基づいた平滑筋細胞形質制御薬、およびスクリーニングするアッセイ系や評価方法は知られていない。本発明は上記事情に鑑みてなされたものであり、BTEB2タンパクが上述した動脈硬化を悪化させるタンパクのプロモーターの遺伝子発現転写調節領域に結合して高い発現活性が誘導されるという特性を利用した平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法、およびこのような評価方法に用いる宿主細胞を提供することを目的とするものである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために本発明は、請求項1において、BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有する宿主細胞を用い、BTEB2と被評価物質との存在下、宿主細胞内で前記レポーター生成物を発現させた後、このレポーター生成物を検出することにより平滑筋細胞の形質変換を制御する物質を評価するようにした。

【0009】このような宿主細胞中で、BTEB2と被評価物質との存在下レポーター生成物を発現させ、検出することにより、被評価物質がBTEB2の有する高い発現活性誘導を阻害するものであるのか否かを評価することができ、これにより被評価物質が平滑筋細胞の形質

変換を制御する物質であるか否かを評価することができる。

【0010】また、本発明においては、請求項2に記載するように、BTEB2が、前記宿主細胞内に導入されたベクターであって、少なくともBTEB2タンパクを発現するBTEB2遺伝子を有する第2のベクターにより産生されたものであることが好ましい。さらに、本発明に用いる宿主細胞は、培養動物細胞であることが好ましく（請求項3）、さらに好ましくは、ヒト腎臓由来の細胞株293細胞（請求項4）もしくはウシ肺動脈内皮細胞株cPAE細胞（請求項5）を用いることである。また、検出の容易性からレポーター生成物は、ルシフェラーゼであることが好ましい（請求項6）

【0011】本発明において、BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターとしては、BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターであれば特に限定されるものではないが、動脈硬化を悪化させるタンパクをコードする遺伝子のプロモーターを用いることが好ましく（請求項7）、特に好ましくは、組織因子プロモーター（請求項8）、Egr-1プロモーター（請求項9）、iNOSプロモーター（請求項10）およびSMembプロモーター（請求項11）を用いることである。

【0012】そして、本発明の請求項12に記載した発明は、BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有する宿主細胞である。このような宿主細胞を用いることにより、平滑筋細胞の形質変換を制御する物質を評価することができる。この場合、上記請求項2の場合と同様に、BTEB2タンパクを発現するBTEB2遺伝子を少なくとも有する第2のベクターが導入された宿主細胞であることが好ましい（請求項13）。また、本発明の請求項14に記載した発明は、上述したBTEB2を用いた評価方法により得られた平滑筋細胞形質変換制御剤である。

#### 【0013】

【発明の実施の形態】以下、本発明の平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法およびこの方法に用いる宿主細胞について具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0014】本発明の平滑筋細胞の形質変換を制御する物質の評価方法は、BTEB2と結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを少なくとも有する宿主細胞を用い、BTEB2と被評価物質との存在下、宿主細胞内で前記レポーター生成物を発現させた後、このレポーター生成物を検出することを特徴とするものである。

【0015】一般に転写を調節するタンパクは、特異的

DNA配列を結合させる能力およびそれらの配列を含有する特異的プロモーターを調節する能力を有する。かかるタンパクは、一般に少なくとも2つの機能、DNA結合能力および転写調節能を保有する。DNAへの結合に際し、タンパクの転写調節ドメインは、調節タンパクのDNA結合部位へ作動可能に連結した遺伝子の転写を変化させる（活性化または抑制する）。一方、一般にある遺伝子のプロモーター領域には、いくつかの転写因子結合部位が存在し、それぞれの結合タンパクがその遺伝子の転写を調節する。

【0016】本発明においては、この転写を調節するタンパクとして、BTEB2を用いたところに特徴を有するものである。このBTEB2は、上記第1のベクターを有する宿主細胞がレポーター生成物を発現する際に被評価物質と共に存在する必要がある。したがって、BTEB2を直接添加することも可能であるが、好ましくは、上記第1のベクターを有する宿主細胞にBTEB2タンパクをコードする遺伝子を少なくとも有する第2のベクターを導入することが好ましい。なお、この第1のベクターと第2のベクターは、単一のベクターであつてもよい。

【0017】このような第2のベクターに用いられるBTEB2をコードする遺伝子としては、宿主細胞中でBTEB2を発現しうるものであれば特に限定されるものではないが、例えばヒト由来のもの(Sogawa K. et al. Nucleic Acid Research 21,1527-1532, 1993)、ウサギ由来のもの(Watanabe N. et al. Circulation 94, 1-107, 1996)、ラット由来のもの(Imatake et al. (1992) EMBO J.11, 3663-3671)等を挙げることができる。本発明においては、中でもヒト由来のものを好ましい。また、このBTEB2遺伝子を発現させるためのベクターとしては、通常用いられる遺伝子発現用のプラスミドであれば特に限定されるものではなく、例えばpcDNA3 (Invitrogen社製)等を挙げることができる。なお、この第2のベクターにおいてBTEB2遺伝子は発現可能に連結されている必要があり、所定のプロモーター、ターミネーター等を含むものである。

【0018】本発明においては、このBTEB2に特異的に結合するDNA部位を有するプロモーターと、その下流に作動可能に連結されたレポーター生成物をコードする遺伝子とを含む第1のベクターを用いる。ここで、BTEB2に特異的に結合するDNA部位を有するプロモーターとしては、上述した動脈硬化を悪化させるタンパク、すなわち平滑筋細胞の形質が収縮型から合成型に変化する際に発現が変化するタンパクをコードする遺伝子が本来有するプロモーターであつて、BTEB2に特異的に結合するDNA部位を有するものが用いられる。このようなプロモーターとしては、例えば組織因子プロモーター、Egr-1プロモーター、iNOSプロモーター、SMem bプロモーター等を挙げることができ

る。これらのプロモーターの配列は、SMemb (真鍋一郎ら、最新医学、50:68(1995))、組織因子 (Mackman N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA,87:2254 (1990))、Egr-1 (Sakamoto KM et al., Oncogene, 6:867 (1991))、およびiNOS (Chartrain NA et al., Journal of Biological Chemistry, 269:6765 (1994))において明らかとされている。

【0019】また、本発明に用いられるレポーター生成物としては、宿主細胞内で発現可能であり、その検出が比較的容易なものであれば特に限定されるものではないが、発光量を測定することにより検出が容易な点でルシフェラーゼを用いることが好ましい。本発明に用いられる第1のベクターは、上述したプロモーターにレポーター生成物をコードする遺伝子を作動可能に連結した構築物を含むものであり、市販のプラスミドにこのような構築物を挿入することにより得ることができる。

【0020】本発明においては、このような第1のベクターと必要であれば上記第2のベクターを宿主細胞に導入する。これらのベクターを宿主細胞に導入する方法は、例えばリン酸カルシウム法等の一般的な方法により行うことができる。ここで用いられる宿主細胞としては、特に限定されるものではないが、培養動物細胞を用いることが好ましく、なかでもヒト腎臓由来の細胞株293細胞(ATCC受託番号CRL-1573)やウシ肺動脈内皮細胞株cPAE細胞(ATCC受託番号CCL-209)等を用いることが好ましい。また、本発明において被評価物質は、第1のベクター及び必要であれば第2のベクターを宿主細胞に導入する際、その培地に添加することにより宿主細胞に接触させることが好ましい。

【0021】本発明の評価方法は、上記第1のベクターが導入された宿主細胞をBTEB2および被評価物質の存在下、もしくは上記第1のベクターおよび第2のベクターが導入された宿主細胞を被評価物質の存在下培養した後、宿主細胞が産生するレポーター生成物を検出することにより行われる。すなわち、被評価物質がBTEB2タンパクの活性を阻害するものであれば、検出されるレポーター生成物の量は少なくなり、これによりこの被評価物質が平滑筋細胞形質変換の制御剤として用いる可能性があると判断でき、また検出されるレポーター生成物の量が被評価物質の存在の有無にかかわらず変化がない場合は、制御剤として用いることができないと判断することができる。したがって、この評価方法により平滑筋細胞の形質変換を制御する物質のスクリーニングを正確かつ簡便に行うことができ、その結果、有効な平滑筋細胞形質変換制御剤を得ることができる。

【0022】なお、本明細書で用いる「作動可能に連結」とは、2つのマクロ分子要素が、第1の要素の活性が第2の要素に効果を誘導するように配置されていることを意味する。この意味で、プロモーター要素の活性の

調節は作動可能に連結した暗号配列の発現を変化および／または調節するのに用いることができる。例えば、プロモーター要素に作動可能に連結した暗号領域の転写はプロモーターの活性を「活性化」する因子によって誘導され、プロモーター要素に作動可能に連結した暗号配列の転写はプロモーターの活性を「抑制する」因子によって抑制される。このように、暗号配列活性の転写がプロモーターの活性によって影響されるならば、プロモーター領域は暗号配列に作動可能に連結している。

【0023】また、本明細書における「被評価物質」は、固体、液体、または気体のいずれかを問わない。ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または脂肪のごとき合成化合物、天然産物およびマクロ分子の物質、ならびに神経伝達物質、リガンド、ホルモンまたは元素化合物のごとき小さな物質をも含むものである。

【0024】さらに、本明細書における「プロモーター」とは、作動可能に連結した配列の5'末端における転写の開始部位に隣接して位置するDNA配列である。プロモーターは作動可能に連結した遺伝子の転写を調節するように相互作用する1種またはそれを超える調節要素またはモジュールを含有する。

【0025】また、本明細書で用いる「発現」とは、遺伝子内にコードされた情報が現れる過程である。遺伝子がタンパクをコードする場合、発現は、mRNAへのDNAの転写、(必要ならば)mRNAの成熟mRNAへのプロセッシング、および成熟mRNAのタンパク産物への翻訳をともに含有するものである。

#### 【0026】

【実施例】以下に本発明の実施例を示す。なお、組換えDNAの一般的手法は特に断らない限りモレキュラーローニング(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, T. Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982)にしたがって行った。

#### (実施例1)

#### プラスミドの調製

BTEB2のcDNAの発現プラスミドは、ソガワ等の文献(Sogawa K. et al. Nucleic Acid Research 21, 1527-1532, 1993)に記載のBTEB2 cDNAの1番から219番までを、遺伝子発現用のプラスミド pcDNA3 (Invitrogen 社製) の EcoRI、XhoI制限酵素切断断片に挿入して得たプラスミド pcDNA3/BTEB2を使用した。

【0027】組織因子のプロモーターを作動可能に連結したルシフェラーゼレポータープラスミドは、マックマン等(Mackman N. et al. Proceeding of National Academy of Science in USA, 87:2254 (1990))に記載の pL3を使用した。pL3には組織因子遺伝子の-383~+121が連結されている。

#### 【0028】細菌細胞の増殖と形質転換

細菌宿主を増殖させ、標準的な技術(Ausubel FMら, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publish

ing Associates (1987)、およびMiller J, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1972))によりプラスミド pcDNA3/BTEB2 と pL3 を用いて形質転換した。プラスミドを担持する細菌を、100  $\mu$ g/ml のアンピシリン薬剤を含有するLB培地中で増殖させた。Escherichia coli DH5 $\alpha$ をプラスミドDNAの構築用の細菌宿主として用いた。

#### 【0029】哺乳動物細胞の増殖およびトランスフェクション

10%胎仔ウシ血清を含有するミニマム エッセンシャル ミディアム (minimum essential medium) 培地で、ヒト腎臓由来の細胞株293細胞(ATCC受託番号CRL-1573)およびウシ肺動脈内皮細胞株cPAE細胞(ATCC受託番号CCL-209)を、37℃のCO<sub>2</sub> インキュベータで増殖させ、トランスフェクションに使用した。また、前述したEscherichia coli DH5 $\alpha$  pcDNA3/BTEB2 およびEscherichia coli DH5 $\alpha$  pL3をそれぞれアンピシリン薬剤含有LB培地中に増殖させ、アルカリSDS法によりプラスミド pcDNA3/BTEB2 およびプラスミド pL3を回収した。回収したプラスミドは動物細胞にトランスフェクトするため、ポリエチレングリコールによる沈殿法により精製した。

【0030】2 $\times$ 10<sup>5</sup>個に調製したヒト腎臓由来の細胞株293細胞またはウシ肺動脈内皮細胞株cPAE細胞に、1.0  $\mu$ gのプラスミド pcDNA3/BTEB2 と 1.0  $\mu$ gのプラスミド pL3をコトランスフェクションした。コントロールとしてプラスミド pcDNA3/BTEB2 1.0  $\mu$ gの代わりにプラスミド pRc/CMV(Invitrogen 社製) 1.0  $\mu$ gを用いて同様にコトランスフェクションした。トランスフェクションは、標準的なリン酸カルシウム法(Current Protocols in Molecular Biology)にしたがって行った。トランスフェクションした細胞の培養は、10%胎仔ウシ血清を含有するミニマム エッセンシャル ミディアム (minimum essential medium) 培地を用いて37℃のCO<sub>2</sub> インキュベータで行った。

#### 【0031】ルシフェラーゼアッセイ

前掲のプロトコル(Current Protocols in Molecular Biology)に記載されているごとくに、培養した細胞の抽出物を調製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼの活性は酵素反応によって発光する光を、発光検出器(Lumat LB9507)によって定量化した。該機械の専用のアッセイチューブに細胞抽出液を入れ、発光検出器の中でルシフェラーゼの基質であるルシフェリンを自動的に添加した。実験の結果を図1に示す。

【0032】pRc/CMV プラスミドではルシフェラーゼの活性が検出されないが、BTEB2発現プラスミドを遺伝子導入した293細胞は、pRc/CMVの場合に比べて約20倍のルシフェラーゼ活性が検出された。この結果は、BTEB2が組織因子の遺伝子の転写調節をしたこ

とを示す。

### 【0033】(実施例2)

BTEB2の転写活性化に対する Mithramycin, Adriamycin, Netropsin, Staurosporine の効果

ウシ肺動脈内皮細胞株 c PAE細胞 (ATCC受託番号 CCL209) を10cm dish (岩城硝子社製) で alpha MEM (GIBCO BRL社製) 10%牛胎児血清 (三光純薬社製) 培地を用いて培養した。OPTI-MEM (GIBCO BRL社製) 500mlに、pL3 と pcDNA1.1Amp (Invitrogen 社製)、また、pL3 と pcDNA3/BTEB2 をそれぞれ10mgずつ加え、混和し、これをA液とした。LIPOFECTAMINE Reagent (GIBCO BRL社製) 30mlをOPTI-MEM 500ml中に加え、これをB液とした。A液とB液とを穏やかに混和し、30分間室温に静置した。この間に、5ml OPTI-MEM で2回細胞を洗浄し、4mlのOPTI-MEMを加えた。これに、前述のA液とB液とを混和したDNA溶液を添加し、37℃、5時間インキュベート後、培地交換を行った。この細胞をさらに37℃で18時間培養した後、96 well plate (岩城硝子社製) に、40 cells/mlの細胞液を100mlずつ撒いた。37℃で6時間インキュベートし、細胞を完全に接着させた。DM

SOに溶けている Mithramycin, Adriamycin, Netropsin、およびStaurosporine を無血清培地を用いて濃度を調整し、各10ml/well 添加した。コントロールとしてDMSOを無血清培地で1%に希釈したものを10ml/well 添加した。化合物を添加後、37℃で24時間培養し、ルシフェラーゼ アッセイを行った。

【0034】ルシフェラーゼ アッセイは、まず well

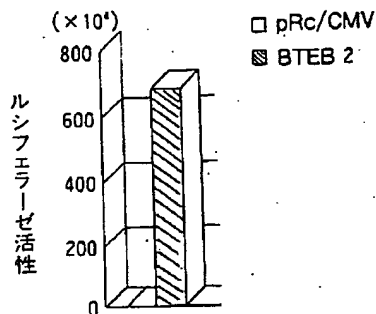
の中の培地を取り除き、各 well を100mlのPBSで

洗浄して、Lysis buffer (22.2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.2% Trion

X) を75ml/well 加え、攪拌し、細胞を粉碎した。この細胞抽出液を各50mlずつ白色96 well Plate (住友ベークライト社製) に移し、Luminometer (AutoLuma

t LB96P) でルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図2

【図1】



から図5に示す。なお、図2はAdriamycin、図3はMithramycin、図4は Netropsin、図5は Staurosporineの結果である。図から明らかなように、Mithramycin およびAdriamycinが濃度依存的にBTEB2の転写活性を抑制した。

【0035】なお、本発明は上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は、例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

### 【0036】

【発明の効果】本発明は、BTEB2タンパクが組織因子プロモーター等のBTEB2が特異的に結合するDNA部位を有するプロモーターに結合して、高い発現活性が誘導されることを利用して、BTEB2タンパクの活性を組織因子プロモーターに結合して作動するレポーター遺伝子の発現として検出する系を構築し、提供したものである。この様な特異性を備えたスクリーニングアッセイ系はこれまでにないアッセイ系で、平滑筋細胞の形質制御薬という新しい概念の薬剤の探索を簡便に高感度に行えるものである。また、既存の薬剤の平滑筋形質制御作用の有無を簡便に検出するのに有用である。

### 【図面の簡単な説明】

【図1】293細胞におけるBTEB2の転写調節活性を示すグラフである。

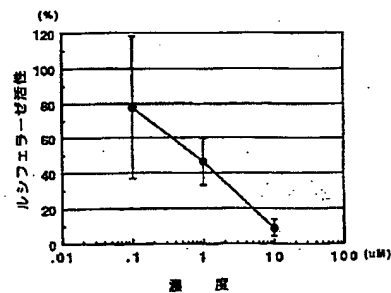
【図2】Adriamycinを添加したときのBTEB2による転写活性を示すグラフである。

【図3】Mithramycinを添加したときのBTEB2による転写活性を示すグラフである。

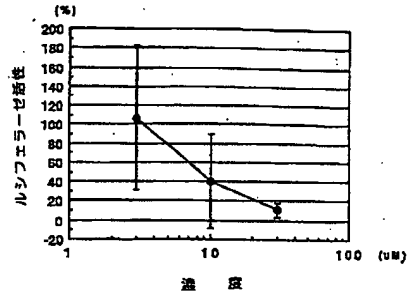
【図4】Netropsinを添加したときのBTEB2による転写活性を示すグラフである。

【図5】Staurosporineを添加したときのBTEB2による転写活性を示すグラフである。

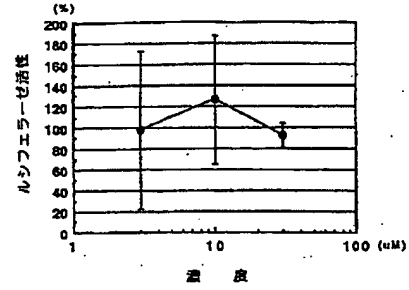
【図2】



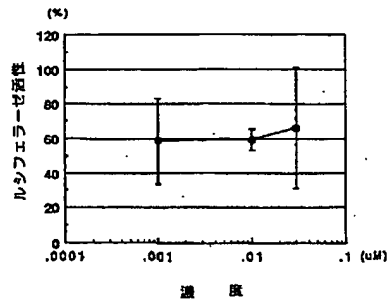
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/53

//(C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

C 1 2 N 5/00

D

B